



УКРАЇНА

(19) UA (11) 10174 (13) U

(51) 7 G01N30/22

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ЛОВАСТАТИНУ В БІОЛОГІЧНІЙ РІДИНІ

1

(21) u200501567

(22) 21.02.2005

(24) 15.11.2005

(46) 15.11.2005, Бюл № 11, 2005 р.

(72) Яковлева Ольга Олександрівна, Марченко Каріна Геннадіївна, Пентюк Олександр Олексійович, Серкова Валентина Костянтинівна, Ільченко Олександр Володимирович

(73) ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І.ПИРОГОВА

2

(57) Спосіб визначення концентрації ловастатину в біологічній рідині, що полягає в екстрагуванні ловастатину в біологічній рідині в органічний розчинник методом рідинної хроматографії з використанням спектрофотометричного детектування, який відрізняється тим, що як екстрагент використовують ацетонітрил, який безпосередньо вводять до хроматографічної колонки

Корисна модель відноситься до аналітичних методів в біохімії, а саме до методів визначення концентрації ловастатину (препарату групи гіпохолестеринемічних засобів, інгібітору 3-гідроксі-3-метилглутаріл-CoA-редуктази) методом високо-ефективної рідинної хроматографії і може бути використаний для контролю параметрів фармакокінетики цього препарату, що у свою чергу дає можливість приймати препарат в оптимальній дозі і в певний момент часу.

Найбільш близьким за сукупністю ознак до запропонованого є метод визначення ловастатину у біологічних рідинах з використанням екстракції до суміші етилацетат-ацетон (2:1, об/об) з подальшим випаровуванням органічних розчинників під струмом азоту, реекстракцією до ацетонітрилу та розведенням одержаного реекстракту водою [Comparison of Cytochrome P-450-Dependent Metabolism and Drug Interactions of the 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA Reductase Inhibitors Zorastatin and Pravastatin in the Ziver / W Jacobsen, G Kirehner, K.Hallensleben et al. // Drug Metab. Dispos. - 1999, V. 27. - issne 2. P.173-179].

Однак відомий спосіб складний, потребує значних затрат та недостатньо точний

В основу корисної моделі поставлене завдання розробити швидкий та дешевий метод визначення концентрації ловастатину у біологічній рідині, підвищення точності визначення шляхом зміни методу прободготовки.

Поставлене завдання досягається способом визначення концентрації ловастатину в біологічних рідинах, що передбачає екстрагування ловастатину в біологічній рідині в органічний розчинник, рідинну хроматографію з використанням спектрофотометричного детектування, в якому згідно з корисною моделлю як екстрагент використовують ацетонітрил, який безпосередньо вводять до хроматографічної колонки.

Метод значно спрощується завдяки заміні міжфазної екстракції у двофазних системах (рідина-рідина або у твердофазному патроні) на однофазну екстракцію у ацетонітрил

Використання однофазної екстракції є набагато дешевшою процедурою у порівнянні з екстракцією на дорогих твердофазних патронах, що особливо відчутно при проведенні багатосерійних рутинних досліджень.

Завдяки тому, що ацетонітрил є ефективним біокоаджунгуючим агентом, його застосування дозволяє уникнути цілої низки операцій - екстрагування, видалення розчинника, реелюювання. Виключення цієї низки операцій, у свою чергу, заводить втрати ловастатину під час прободготовки практично до нуля.

При проведенні однофазної екстракції ацетонітрил додають до біологічної рідини, після чого суміш рідин ретельно перемішують. Після перемішування білковий осад відокремлюють центрифугуванням.

UA (19) 10174 (13) U

Одержаний розчин ловастатину вводять безпосередньо до хроматографічної колонки із зворотньофазною насадкою.

Зниження концентрації ловастатину у рідині, яку вводять в колонку, у порівнянні з традиційними методами хроматографічної прободготовки не є критичним, чому сприяють достатня чутливість сучасних хроматографічних детекторів. Натомість значно скорочується час виконання аналізу у порівнянні з традиційними хроматографічними методами.

Склад елюенту у порівнянні з відомими методами змінювати практично не доводиться, тим більше, що він практично співпадає із складом рідини, що вводиться після етапу однофазної екстракції до хроматографічної колонки. Так само залишається незмінною довжина хвилі світла, при якій проводять детектування.

Спосіб здійснюється таким чином.

До 0,2мл сироватки крові додають 0,02мл 1н розчину соляної кислоти та 0,6мл ацетонітрилу. Пробу енергійно струшують протягом однієї хвилини. Після цього пробу центрифугують при 1000 об/хв протягом 15 хвилин. Верхній рідкий шар відбирають і фільтрують на мембранному фторопластовому фільтрі МФФКГ-3 (НПФ "Біохром") з розміром пор 0,45мкм.

Кількісне визначення ловастатину проводять на високоефективному рідинному хроматографі HP-1100 "Леонардо" на колонці розмірами 125x14,0мм заповненій твердою фазою Hypersil.

ВДS-C18 з розміром гранул 5мкм. Для захисту колонки використовують передколонку розмірами 12,5x4мм, яку наповнюють такою ж насадкою. В колонку вводять 20мкл відфільтрованого екстракту. Застосовують ізократичне елюювання зі складом мобільної фази (за об'ємом) - 40% 0,04М фосфатного буферу рН=4,0 та 60% ацетон нітрилу. Швидкість елюювання - 1 мл/хв., температура ко-

лонки 20°C. Детектування ловастатину проводять при довжині хвилі 237нм. За цих умов час виходу ловастатину з колонки складає 6,57хв. При зміні концентрації ловастатину у рідині, що вводиться до колонки, від 0,03 до 3,0мкг/мл зберігається пропорційна залежність між площею хроматографічного піку та кількістю препарату в пробі.

Концентрація препарату визначається методом зовнішнього стандарту. Як стандарт використовуються зразки сироватки крові, до яких додається певна кількість препарату. Стандартні зразки піддаються такій самій обробці, як і зразки, що підлягали визначенню вмісту ловастатину.

Оскільки певна частина ловастатину могла переходити до осаду, який утворюється в сироватці після додавання ацетонітрилу, додатково визначають рівень втрат ловастатину в процесі прободготовки. Для цього рівні кількості розчину ловастатину додають до певних об'ємів сироватки та води. Частина водних розчинів піддають повному циклу прободготовки (як і розчини ловастатину в сироватці), а частину водних розчинів вводять до колонки безпосередньо (лише після фільтрування з метою запобігти пошкодженню колонки).

Було продемонстровано, що втрати ловастатину в процесі прободготовки не перевищили 1-2%.

Нами були досліджені також метрологічні параметри визначення ловастатину. Виявилось, що запропонований метод відрізняється точністю, достатньою відтворюваністю та високою чутливістю. Так, при визначенні ловастатину, доданого до сироватки у концентраціях від 0,20 до 2,00мкг/мл (в серіях по 5 паралельних проб), величина відносної похибки середнього результату не перевищувала 4,2% для довірчого інтервалу Р=0,95. Нижня межа визначення ловастатину складала 25нг/мл (відношення "сигнал/шум">10).